









Feed additive containing D-pantothenic acid and/or its salts and method for their preparation**Publication number:** EP1050219 (A1)**Publication date:** 2000-11-08**Inventor(s):** BINDER MICHAEL DR [DE]; UFFMANN KLAUS-ERICH [DE];
WÄLGER ILONA DR [DE]; BECKER ULRICH DR [SK];
PFEFFERLE WALTER DR [DE]; FRIEDRICH HEINZ DR [DE]**Applicant(s):** DEGUSSA [DE]**Classification:****- International:** A23K1/00; A23K1/16; A23K1/175; C12P13/02; A23K1/00;
A23K1/16; A23K1/175; C12P13/00; (IPC1-7): A23K1/16**- European:** A23K1/16B; C12P13/02**Application number:** EP20000106626 20000426**Priority number(s):** DE19991020507 19990505; DE20001016321 20000331**Also published as:** EP1050219 (B1)
 SK8452000 (A3)
 SK283900 (B6)
 RU2245628 (C2)
 PT1050219 (E)

more >>

Cited documents: GB598177 (A)
 GB784434 (A)
 XP004103426 (A)**Abstract of EP 1050219 (A1)**

Animal feed additive based on fermentation liquor containing D-pantothenic acid (I) and/or its salts, contains (a) (I) and/o its salts, (b) 0-100% biomass from microorganisms producing (I) during fermentation and (c) mainly other contents of the fermentation liquor and (d) is in solid, finely-divided or granulated, free-running form. Independent claims are also included for methods of producing animal feed additives containing (I) and/or its salts.

Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide



(12) **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(43) Veröffentlichungstag:
08.11.2000 Patentblatt 2000/45

(51) Int. Cl.⁷: A23K 1/16

(21) Anmeldenummer: 00108826.9

(22) Anmeldetag: 26.04.2000

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE

Benannte Erfindungsstaaten:

AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: 05.05.1999 DE 19920507
31.03.2000 DE 10016321

(71) Anmelder:

Degussa-Hüls Aktiengesellschaft
60287 Frankfurt am Main (DE)

(72) Erfinder:

- Binder, Michael, Dr.
33803 Steinhegen (DE)
- Uffmann, Klaus-Erich
33611 Bielefeld (DE)
- Welger, Ilona, Dr.
33607 Bielefeld (DE)
- Becker, Ulrich, Dr.
97611 Seice (SK)
- Pfefferle, Walter, Dr.
33790 Halle (DE)
- Friedrich, Heinz, Dr.
63457 Hanau (DE)

(54) **D-Pantothensäure und/oder deren Salze enthaltende Futtermittel-Additive und Verfahren zu deren Herstellung**

(57) Die Erfindung betrifft ein Futtermitteladditiv auf Fermentationsgrundlage, das man durch Fermentation von D-Pantothensäure bildenden Mikroorganismen gewinnt und eines oder mehrere Salze der D-Pantothensäure, ausgewählt aus der Gruppe der Natrium-, Kalium-, Ammonium-, Magnesium- oder Calciumsalze, gegebenenfalls unter Zusatz einer oder mehrerer dieser Verbindungen, enthält.

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Tierfuttermittel-Additiv auf Fermentationsbrühebasis, das D-Pantothensäure und/oder eines ihrer Salze enthält und Verfahren zur Herstellung dieses Additivs.

Stand der Technik

[0002] Pantothensäure wird weltweit in einer Größenordnung von mehreren tausend Tonnen pro Jahr produziert. Ein grosser Teil der produzierten Pantothensäure wird für die Ernährung von Nutztieren wie Geflügel und Schweine verwendet. Der Bedarf steigt.

[0003] Pantothensäure kann durch chemische Synthese oder biotechnisch durch Fermentation geeigneter Mikroorganismen in geeigneten Nährlösungen hergestellt werden. Bei der chemischen Synthese ist das DL-Pantolacton eine wichtige Vorstufe. Es wird in einem mehrstufigen Verfahren aus Formaldehyd, isobutyraldehyd und Cyanid hergestellt, in weiteren Verfahrensschritten das racemische Gemisch aufgetrennt, das D-Pantolacton mit β -Alanin kondensiert und so D-Pantothensäure erhalten.

[0004] Die typische Handelsform ist das Calcium-Salz der D-Pantothensäure. Das Calcium-Salz des racemischen Gemisches der D,L-Pantothensäure ist ebenfalls gebräuchlich.

[0005] Der Vorteil der fermentativen Herstellung durch Mikroorganismen liegt in der direkten Bildung der gewünschten stereoisomeren Form, nämlich der D-Form, die frei von L-Pantothensäure ist.

[0006] Verschiedene Arten von Bakterien, wie z. B. *Escherichia coli*, *Arthrobacter ureafaciens*, *Corynebacterium erythrogenes*, *Brevibacterium ammoniagenes* und auch Hefen, wie z. B. *Debaryomyces castellii* können, wie in EP-A-0 493 060, EP-A-0 590 857 und WO 97/10340 gezeigt, unter geeigneten Fermentationsbedingungen D-Pantothensäure produzieren. Besonders geeignete Mikroorganismen sind die dort beschriebenen Derivate von *Escherichia coli* IFO3547 wie z. B. die Stämme FV5069/pFV31 oder FV5069/pFV202.

[0007] Bei der fermentativen Herstellung der D-Pantothensäure, wie sie in EP-A-0 493 060, EP-A-0 590 857 und WO 97/10340 beschrieben ist, wird ein zur D-Pantothensäure Produktion befähigter Mikroorganismus in einem geeignetem Nährmedium kultiviert und die gebildete D-Pantothensäure anschließend in aufwendiger Weise isoliert, gereinigt und als Calciumsalz dargestellt.

[0008] Geeignete Nährmedien enthalten eine Kohlenstoffquelle wie z. B. Glucose oder Stärkemehlhydrolysat oder Sucrose oder Melasse, Vorstufen wie z. B. β -Alanin, D,L-Pantothensäure oder D,L-Pantolacton, eine Stickstoffquelle wie z. B. Ammoniumsulfat, eine Phosphor-Quelle wie z. B. Kaliumphosphat und weitere Salze, Spurenelemente und Vitamine und gegebenenfalls komplexe Medienzusätze wie z. B. Hefeextrakt. Die

Mikroorganismen werden dann in diesem Medium bei einem geeignetem pH-Wert unter entsprechender Belüftung und Rührung inkubiert, wobei diese dann D-Pantothensäure ausscheiden.

[0009] Nach dem derzeitigen Stand der Technik, der in WO96/33283 und EP-A-0 590857 dargestellt ist, wird das Calciumsalz der D-Pantothensäure durch eine aufwendige Isolierung und Reinigung aus der pantothensäurehaltigen Fermentationsbrühe gewonnen. Nach einer ersten Abtrennung der Biomasse durch Filtration oder Zentrifugation erfolgt die weitere Aufarbeitung des Filtrates durch Reinigung mittels Aktivkohle oder durch Säulenchromatographie. Nach der Umsetzung der so erhaltenen Lösungen mit Calciumhydroxid läßt man das gewünschte Ca-Salz auskristallisieren.

[0010] Gemäß der WO 96/33283 entfällt man das Filtrat mit Aktivkohle in der ersten Säule. Mit konzentrierter Salzsäure wird ein pH-Wert von 3,0 eingestellt und die Flüssigkeit anschließend kontinuierlich über zwei weitere mit Aktivkohle gepackten Säulen gereinigt. Die Elution der D-Pantothensäure erfolgt mit Hilfe von Methylalkohol. Nach der sich anschließenden Neutralisation mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Pulver erhält man eine Lösung, aus der man das Calcium D-Pantothanat durch Kristallisation bei 5°C gewinnt.

[0011] Bei der in EP-A-0 590 857 beschriebenen Methode reinigt man das Filtrat zunächst mit Hilfe von Kationen- und Anionenaustauschersäulen. Die Elution erfolgt mit Salzsäure. Die eluierte Fraktion wird anschließend mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ neutralisiert, mit Aktivkohle versetzt und abfiltriert. Das gewonnene Filtrat wird dann in einem niedermolekularen Alkohol (Methanol, Ethanol, Isopropanol) extrahiert und das Calcium D-Pantothanat durch Kristallisation gewonnen.

[0012] Das auf die beschriebene Weise hergestellte Calcium D-Pantothanat wird als Zusatz in Futtermittel für die Tierernährung verwendet.

Aufgabe der Erfindung

[0013] Nach dem Stand der Technik werden Salze der D-Pantothensäure und D,L-Pantothensäure durch Umsetzung der durch chemische Synthese oder Fermentation hergestellten Säuren mit den gewünschten Salzlösungen hergestellt.

[0014] Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, neue als Futtermitteladditive geeignete Zubereitungsformen der D-Pantothensäure und ihrer Salze zur Verfügung zu stellen.

[0015] Weiterhin ist es eine Aufgabe der Erfindung, ein Herstellverfahren zur Verfügung zu stellen, das ökonomischer und leistungsstärker als die gegenwärtig bekannten Verfahren ist.

Beschreibung der Erfindung

[0016] Gegenstand der Erfindung ist ein Tierfuttermittel-Additiv auf Fermentationsbrühe-Basis, das

dadurch gekennzeichnet ist, daß es

- a) D-Pantotheinsäure und/oder deren Salze, insbesondere Alkali- oder Erdalkali-Salze
- b) die während der Fermentation gebildete Biomasse in einer Menge von 0 bis 100 % und
- c) zumindest den überwiegenden Teil der weiteren gelösten Inhaltsstoffe der Fermentationsbrühe enthält und
- d) in fester Form, insbesondere feinteilig oder granuliert und rieselfähig, vorliegt.

[0017] Die Additive liegen im allgemeinen je nach Anforderung als sprühtrocknete oder lyophilisierte, feinteilige, rieselfähige Pulver, aber auch in granulierter Form vor, die unterschiedliche Anteile an Biomasse enthalten können. Die Schüttdichte liegt insbesondere bei ca. 500 kg/m³. Die Additive sind lagerstabil.

[0018] Wird die Biomasse abgetrennt, werden natürlich auch weitere, zum Beispiel anorganische Feststoffe entfernt. Daneben enthält das erfindungsgemäße Additiv zumindest den überwiegenden Teil der in der Fermentationsbrühe gelöst vorliegenden, weiteren gebildeten oder zugesetzten Stoffe, soweit sie nicht durch geeignete Verfahren abgetrennt wurden.

[0019] Zu diesen Stoffen können organische Nebenprodukte gehören, die von den bei der Fermentation eingesetzten Mikroorganismen neben der D-Pantotheinsäure erzeugt und ausgeschieden werden. Dazu gehören L-Aminosäuren, ausserhalb aus der Gruppe L-Methionin, L-Lysin, L-Valin, L-Threonin, L-Alanin oder L-Tryptophan, insbesondere L-Valin. Dazu gehören weiterhin organische Säuren, die ein bis drei Carboxyl-Gruppen tragen wie z. B. Essigsäure, Milchsäure, Zitronensäure, Äpfelsäure oder Fumarsäure. Schließlich gehören dazu auch schlecht verwertbare Zucker wie z. B. Trenhalose. Diese Verbindungen sind gegebenenfalls erwünscht, wenn sie die Wertigkeit des Additivs verbessern.

[0020] Zu diesen Stoffen gehören weiterhin Reste der eingesetzten verwertbaren Zucker wie z. B. Glucose oder Saccharose

[0021] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines D-Pantotheinsäure und/oder deren Salze enthaltenden Futtermittel-Additivs, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man

- a) eine im allgemeinen Natrium-, Kalium-, Ammonium-, Magnesium-, oder Calciumsalze enthaltende D-Pantotheinsäure-enthaltende Brühe durch Fermentation herstellt,
- b) aus dieser gegebenenfalls vollständig oder teilweise die Biomasse abtrennt,
- c) die so erhaltene Lösung bzw. Brühe mit dem Hydroxid oder Oxid eines Erdalkali- oder Alkalimetalls in vorzugsweise stöchiometrischen Mengen, bezogen auf die D-Pantotheinsäure, versetzt und
- d) das so erhaltene Gemisch trocknet, sprühtrock-

net, sprühtrocknet oder granuliert.

[0022] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist Verfahren zur Herstellung von Tierfuttermittel-Additiven mit einem Gehalt an D-Pantotheinsäure und/oder dessen Natrium-, Kalium-, Ammonium-, Magnesium- oder Calciumsalzen in dem Bereich von etwa 20 bis 80 Gew.-% (Trockenmasse) aus Fermentationsbrühen, gekennzeichnet durch die Schritte

a) bevorzugt Entfernen von Wasser aus der Fermentationsbrühe (Aufkonzentration)

b) gegebenenfalls Entfernen der während der Fermentation gebildeten Biomasse in einer Menge von 0 bis 100 %,

c) Zusatz von einer oder mehreren der genannten Verbindungen zu den gemäß a) und b) erhaltenen Fermentationsbrühen, wobei die Menge der zugesetzten Verbindungen so bemessen ist, daß deren Gesamtkonzentration im Tierfuttermittel-Additiv im Bereich von etwa 20 bis 80 Gew.-%, insbesondere 50 bis 80 Gew.-%, liegt, und

d) Trocknen der gemäß c) erhaltenen Fermentationsbrühe, um das Tierfuttermittel-Additiv in der gewünschten Pulver- oder Granulatform zu erhalten.

[0023] Geeignet für das erfindungsgemäße Verfahren sind Fermentationsbrühen, die unter Verwendung von zur Produktion von D-Pantotheinsäure geeigneten Mikroorganismen gewonnen werden und D-Pantotheinsäure und/oder deren Salze enthalten.

[0024] Bei den Mikroorganismen kann es sich um Pilze oder Hefen wie zum Beispiel *Debaryomyces hansenii* oder Gram-positive Bakterien zum Beispiel der Gattung *Corynebacterium* oder um Gram-negative Bakterien wie zum Beispiel die der Familie *Enterobacteriaceae* handeln. Bei der Familie der *Enterobacteriaceae* ist besonders die Gattung *Escherichia* mit der Art *Escherichia coli* zu nennen, innerhalb der Art *Escherichia coli* sind die sogenannten K-12 Stämme wie zum Beispiel die Stämme MG1655 oder W3110 (Neidhardt et al.: *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology (ASM Press, Washington D.C.) oder der *Escherichia coli* Wildtypstamm IFO3547 (Institut für Fermentation, Osaka, Japan) und davon abgeleitete Mutanten zu nennen. Unter den aus IFO3547 hergestellten Stämmen zeichnen sich wiederum FV5069/pFV31 (EP-A-0 590 857) und FV5069/pFV202 (WO 97/10340) aus. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen.

[0025] Die oben beschriebenen Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch-Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zustuf-

verfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der D-Pantothenäure-Produktion kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiele (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991) oder im Lehrbuch von Störmas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994) beschrieben.

[0026] Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Mikroorganismen genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlenhydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Phosphorquelle können Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wachstumsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies Vorstufen der D-Pantothenäure wie Aspartat, β -Alanin, Ketoisovalerat, Ketopantoinsäure oder Pantoinsäure und gegebenenfalls deren Salze zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugeführt werden.

[0027] Zur Kontrolle des pH-Wertes werden bevorzugt Ammoniak oder Ammoniakwasser verwendet. Andere basische Verbindungen wie Natriumhydroxid oder Kaliumhydroxid sind ebenfalls geeignet. Werden saure Verbindungen benötigt, setzt man Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise ein. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung verwendet man Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Pflanzlingen werden dem Medium gegebenenfalls geziel-

nete selektiv wirkende Stoffe z.B. Antibiotika hinzugefügt. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingeblasen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum an D-Pantothenäure gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

[0028] Die so erhaltenen Fermentationsbrühen haben üblicherweise eine Trockenmasse von 7,5 bis 25 Gew.-% und enthalten D-Pantothenäure in einer Konzentration von > 0 bis 20 Gew.-%. Besonders vorteilhaft sind solche Fermentationsverfahren, bei denen die D-Pantothenäure zu 2 bis 20 Gew.-% in der Trockenmasse nach Beendigung der Fermentation vorliegt. Vorteilhaft ist außerdem auch, wenn die Fermentation zumindest am Ende, vorteilhaft jedoch über mindestens 30 % der Fermentationsdauer zuckerlimitiert gehalten wird. Das heißt, daß während dieser Zeit die Konzentration an verwertbarem Zucker im Fermentationsmedium auf ≥ 0 bis 5 g/l gehalten bzw. darauf abgesenkt wird.

[0029] In einer Ammoniumionen enthaltenden Variante zur Herstellung der erfindungsgemäßen Additive werden die D-Pantothenäure-haltigen Fermentationsbrühen, gegebenenfalls zunächst durch bekannte Separationsmethoden wie zum Beispiel der Zentrifugation, der Filtration, dem Dekantieren oder einer Kombination hieraus vollständig oder zum Teil von der Biomasse befreit. Es ist erfindungsgemäß jedoch auch möglich, die Biomasse gänzlich in der Fermentationsbrühe zu belassen. Anschließend wird diese Brühe im allgemeinen mit 0,8 bis 1,2, vorzugsweise 0,95 bis 1,1 Äquivalenten, eines Oxids oder Hydroxids eines Alkali- oder Erdalkali-Metall, insbesondere NaOH, KOH, Ca(OH)_2 oder MgO , bezogen auf die D-Pantothenäure, versetzt. Bei geringen D-Pantothenäurekonzentrationen kann es vorteilhaft sein, auch deutlich höhere Mengen der Oxide oder Hydroxide einzusetzen, zum Beispiel im Bereich 1,2 bis 4 Äquivalenten. Die auf diese Weise erhaltene Suspension wird vor der Trocknung im allgemeinen auf maximal 60 Gew.-% Trockenmasse konzentriert. Es ist gleichfalls möglich, die Fermentationsbrühe zunächst zu konzentrieren und dann die Oxide oder Hydroxide hinzuzufügen. Das erhaltene Konzentrat wird dann in einem üblichen Trockner oder beispielsweise mit Hilfe eines Fallfilmverdampfers oder eines Dünnschichtverdampfers oder eines Sprühtrockners oder eines Sprühgranulators oder einer Gelfriertrocknungsanlage als rieselfähiges, freifließendes, feinteiliges Pulver oder Granulat gewonnen. Eine Granulation kann auch im Anschluß an die Trocknung stattfinden, zum Beispiel in Form der Aufbaugranulation.

[0030] Die Erfinder fanden weiterhin eine neue Methode, um Ammonium-, Kalium-, Natrium-, Magnesium- oder Calcium- D-Pantothenäure-Salze enthaltende Pulver oder diese enthaltende

Zubereitungsformen auf schnelle und kostengünstige Weise herzustellen. Hierzu wird eine unter Verwendung der entsprechenden Hydroxy-Verbindungen hergestellte, D-Pantothensäure-haltige Fermentationsbrühe gegebenenteils zunächst durch bekannte Separationsmethoden wie zum Beispiel der Zentrifugation, der Filtration, dem Dekantieren oder einer Kombination hieraus ganz oder zum Teil von der Biomasse befreit. Es ist erfindungsgemäß jedoch auch möglich, die Biomasse gänzlich in der Fermentationsbrühe zu belassen. Anschließend wird die gegebenenfalls vorbehandelte Brühe mit bekannten Methoden zum Beispiel mittels eines Rotationsverdampfers oder Dünnschichtverdampfers oder Fallfilmverdampfers eingedickt und getrocknet. Die gegebenenfalls aufkonzentrierte Brühe wird anschließend durch Methoden der Sprühtrocknung, Sprügranulation oder Gefriertrocknung oder durch anderweitige Verfahren zu einem rieselfähigen, frei fließenden, feinteiligen Pulver oder Granulat verarbeitet.

[0031] Die erfindungsgemäßen neuen Tierfuttermittel-Additive enthalten im allgemeinen 20 - 80 Gew.-%, vorzugsweise 30 - 75 Gew.-% D-Pantothensäure und/oder deren Salze, bezogen auf die Gesamtmenge. Sie enthalten zusätzlich im allgemeinen anorganische Bestandteile mit einer Menge von 2,5 - 25 Gew.-% und gegebenenfalls organische Nebenprodukte in einer Menge von > 0 bis 30 Gew.-%. Der Anteil an Biotrockenmasse beläuft sich auf 0 bis 35 Gew.-%. Der Wassergehalt liegt bevorzugt bei < 5 Gew.-%. Der gewünschte Gehalt an D-Pantothensäure und/oder einem oder mehreren der genannten Salze wird gegebenenfalls durch Zusatz der entsprechenden Verbindungen zu den fermentativ hergestellten Produkten erzielt. Die gewünschten Verbindungen werden bevorzugt vor der Trocknung oder Sprühtrocknung, insbesondere nach der Aufkonzentrierung, dem Gemisch in Form von Lösungen oder Trockensubstanzen zugesetzt und mit diesen vermischt. Das so erhaltene Produkt wird als Futtermitteladditiv eingesetzt.

[0032] Die Konzentration an D-Pantothensäure kann mit bekannten Verfahren (Velisek; Chromatographic Science 60, 515-560 (1992)) bestimmt werden.

Beispiele

[0033] Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert. Zu diesem Zweck wurden Versuche mit dem D-Pantothensäure produzierenden Stamm *Escherichia coli* 5089/pFV31 durchgeführt, der als FERM-BP 4395 gemäß Südpazifikvertrag beim Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology in 1-1-3, Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki (Japan) hinterlegt ist.

Beispiel 1

Herstellung einer D-Pantothensäure haltigen Fermentationsbrühe

1. Herstellung des Inokulums

[0034] Eine Probe von *Escherichia coli* FV5089/pFV31 wurde auf LBG-Agar ausgestrichen, der mit 50 µg pro ml Ampicillin supplementiert worden war. Diese Agarplatten-Kultur wurde 17 Stunden bei 37°C inkubiert und dann im Kühlschrank bei +4°C aufbewahrt. Ausgewählte Einzelkolonien wurden anschließend in LBG-Bouillon weiter vermehrt. LBG-Bouillon hat folgende Zusammensetzung: 10 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl und 1 g/l Glucose. LBG-Agar enthält zusätzlich 12 g/l Agar. Vorgefertigte Zubereitungen können von der Firma Gibco/BRL (Paisley, Schottland, Großbritannien) als LB Broth Base oder LB-Agar bezogen werden. Nach Zusatz von 1 g/l Glucose erhält man dann die angegebenen Medien. Kulturen von 10 ml, die in 100 ml Erlenmeyerkolben enthalten waren, wurden für 16 Stunden bei 37°C und 180 rpm auf einem ESR Inkubator der Firma Kühner AG (Birsfelden, Schweiz) inkubiert. Im Anschluß wurde die Zeilsuspension auf einer J-6B Zentrifuge der Firma Beckmann (Hannover, Deutschland) 15 Minuten bei 4000 rpm ab zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml LBG-Medium, das mit 20% Glycerin supplementiert worden war, resuspendiert und in 10 Aliquots je 1 ml unter sterilen Bedingungen abgefüllt und bei -70°C eingefroren. Diese Kulturen wurden als „master-Zellbank (master cell bank)“ verwendet.

[0035] Für die Herstellung einer Arbeitszellbank (working cell bank) wurde LBG-Medium, das mit 50 µg/ml Ampicillin supplementiert worden war, in 10 ml Portionen in 100 ml Erlenmeyerkolben verteilt und anschließend mit 100 µl der oben beschriebenen „master-Zellbank“ beimpft. Die Inkubation erfolgte für 16 Stunden bei 37°C und 180 rpm auf einem ESR Inkubator der Firma Kühner AG (Birsfelden, Schweiz). Nach der Inkubation wurde die optische Dichte (OD) der Kultursuspension mit einem LP2W-Photometer der Firma Dr. Lange (Berlin, Deutschland) bei einer Messwellenlänge von 680 nm bestimmt. Sie betrug 3,5. Anschließend wurde die Zeilsuspension in sterilen 30 ml Polyethylenröhrchen der Firma Grainer (Frickershausen, Deutschland) unter sterilen Bedingungen abgefüllt und bei 2500 rpm für 15 Minuten mit einer Zentrifuge vom Typ J-6B der Firma Beckmann (Hannover, Deutschland) ab zentrifugiert. Die abgetrennte Biomasse wurde in 10 ml LBG-Medium, das mit 20% Glycerin supplementiert worden war, resuspendiert. In 1 ml wurde die Zeilsuspension in 500 µl Portionen in 1 ml sterilen, der Firma Nalgene (New York, U.S.A.) unter sterilen Bedingungen abgefüllt und bei -70°C eingefroren. Die auf diese Weise hergestellten Konserven wurden als Arbeitszellbank (working cell bank) verwendet.

2. Herstellung einer D-Pantothensäure haltigen Fermentationsbrühe

[0036] Zur Herstellung einer Pantothensäure-haltigen Fermentationsbrühe wurde die Arbeitszellbank zunächst in einer Schüttelkolbenkultur vermehrt und diese zur Beimpfung eines Vorfermenters verwendet. Die Kultur des Vorfermenters wurde zur Beimpfung des Produktionsfermenters verwendet.

[0037] Für die Schüttelkolbenkultur wurde das Medium SKA verwendet. Medium SKA wurde folgendermaßen zubereitet. In einem 1 l Becherglas wurden 7,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 g KH_2PO_4 , 1,0 g K_2HPO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,01 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,01 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,005 g $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ und 20 g Maisqueiwwasser abgewogen, das zuvor mit 25%-iger Ammoniaklösung auf pH 6,8 eingestellt worden war, und anschließend 875 ml destilliertes Wasser dazugegeben. Diese Maisqueiwwasser haltige Salzlösung wurde im Autoklav bei 121°C für 20 Minuten sterilisiert. Weiterhin wurde eine Lösung bestehend aus 125 g destilliertem Wasser, 28,7 g Glucose und 0,002 g Thiamin-HCl durch Filtration sterilisiert. 10 g CaCO_3 wurden in einem 100 ml Kolben abgewogen und im Autoklaven bei 123°C für 20 Minuten sterilisiert. Durch Vereinigung der beiden oben genannten Komponenten mit der Maisqueiwwasser haltigen Salzlösung wurde das Medium SKA erhalten.

[0038] Dieses Medium SKA wurde in 12,5 ml Portionen in 100 ml Erlanmeyerkolben verteilt und anschließend mit 0,5 ml einer Zellsuspension beimpft. Als Zellsuspension wurde eine mit steriler physiologischer Kochsalzlösung 1:100 verdünnte Konserve der Arbeitszellkultur verwendet. Die Inkubation erfolgte für 20 Stunden bei 32°C und 150 rpm auf einem RC-1-TK Inkubator der Firma Infors AG (Bottmingen, Schweiz). Die im Anschluß daran bestimmte optische Dichte bei einer Messwellenlänge von 660 nm (OD 660) betrug 12,5.

[0039] 0,5 ml dieser Schüttelkolbenkultur wurden mit 4,5 ml physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und davon 0,7 ml zum Beimpfen von 1300 ml Anzuchtmedium verwendet, die in einem 2 l Laborfermenter vom Typ Biotas[®] MD der Firma Braun Biotech GmbH (Melsungen, Deutschland) vorliegen.

[0040] Das Anzuchtmedium wurde folgendermaßen zubereitet. Eine Lösung bestehend aus 9,81 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,7 g KH_2PO_4 , 1,402 g K_2HPO_4 , 0,70 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,014 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,014 g $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ und 28,04 g Maisqueiwwasser in 1300 ml Leitungswasser wurde auf pH 6,5 mit 25%-iger Ammoniaklösung eingestellt und im Autoklaven bei 121°C für 20 Minuten sterilisiert. Zu dieser Maisqueiwwasser haltigen Salzlösung wurde eine separat sterilisierte Lösung, die in 100g destilliertem Wasser 40,62 g Glucose und 0,0042 g Thiamin-HCl enthielt, unter sterilen Bedingungen hinzugegeben.

[0041] Die Fermentation erfolgte für 16 Stunden bei

37°C und einer Belüftung von 1 vvm. Der Gelöstsauerstoff wurde bei 20% und der pH bei 6,5 gehalten. Als pH-Korrekturmittel wurde 25%-ige Ammoniaklösung eingesetzt. Die optische Dichte betrug 13,1. 90 ml dieser Kultur wurde zum Beimpfen von 1144 ml Wachstumsmedium für die Hauptfermentation in einem 2 l Laborfermenter vom Typ Biotas[®] MD verwendet.

[0042] Das Wachstumsmedium wurde folgendermaßen zubereitet. Eine Lösung bestehend aus 4,14 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,744 g KH_2PO_4 , 1,0 g K_2HPO_4 , 0,83 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,0124 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 18,87 g β -Alanin, 0,74 g Struktol JB47 und 48,72 g Maisqueiwwasser in 1144 ml Leitungswasser, wurde auf pH 6,5 mit 25%-iger Ammoniaklösung eingestellt und im Autoklaven bei 121°C für 20 Minuten sterilisiert. Zu dieser Maisqueiwwasser haltigen Salzlösung wurde eine separat sterilisierte Lösung, die in 100 ml destilliertem Wasser 35,92 g Glucose, und 0,002 g Thiamin-HCl enthielt, unter sterilen Bedingungen hinzugegeben.

[0043] Die Fermentation erfolgte für 40 Stunden bei 37°C. In der Wachstumsphase betrug der pH 6,5 und die Belüftung 1 vvm. In der Produktionsphase betrug der pH 6,0 und die Belüftung 1,5 vvm. Der Gelöstsauerstoff wurde in beiden Phasen unter 2% gehalten. Als pH Korrekturmittel wurde die 25%-ige Ammoniaklösung verwendet. Während der Fermentation wurde das Produktionsmedium 1, das Produktionsmedium 2 stufenweise zugeführt. Maisqueiwwasser wurde während der Kultivierung einmalig zugegeben. Das Produktionsmedium enthält in 584 ml Leitungswasser 465,29 g Glucose und 0,0261 g Thiamin-HCl, die sterilisiert wurden. Das Produktionsmedium 2 enthält 37,5 g β -Alanin in 140 ml Leitungswasser, welches bei 121°C 20 Minuten im Autoklaven sterilisiert wurde. Nach einer Fermentationszeit von 7,5 Stunden bis zum Ende der Kultivierung wurde das Produktionsmedium 1 stufenweise zugeführt. Nach 10,5 Stunden Kultivierung wurden zusätzliche 49,5 g Maisqueiwwasser, welches in 100 ml Leitungswasser gelöst waren und für 20 Minuten bei 121°C im Autoklav sterilisiert wurden, unter sterilen Bedingungen zugegeben. Nach einer Fermentationszeit von 12,5 Stunden bis zum Ende der Kultivierung wurde das Produktionsmedium 2 mit einer Dosierpumpe von 3,5 g/h zugeführt. Nach 41 Stunden der Kultivierung wurde in der Fermentationsbrühe eine Pantothensäurekonzentration 6,1 Gew.-% gefunden.

[0044] Das Gehalt an D-Pantothensäure wurde mit Hilfe einer HPLC (Hochleistungs Flüssig Chromatographie) Anlage vom Typ M321 der Firma Knauer (Berlin, Deutschland) mittels RI-(Refraktion Index) Detektion unter Verwendung einer Hypersil APS5 Aminophase von 5 μm Korngröße bestimmt.

Beispiel 2

[0045] Bei einem Fermentationsversuch, der unter gleichen Bedingungen, wie in Beispiel 1 beschrieben, durchgeführt wurde, konnte nach einer Kultivierungszeit

von 43 Stunden eine Pantothensäurekonzentration von 5,4 Gew.-% in der Fermentationsbrühe nachgewiesen werden. Die Konzentration an L-Valin betrug 8 g/l.

Beispiel 3

Herstellung von D-Calcium-Pantothemat

[0046] Aus einer pantothensäurehaltigen Fermentationsbrühe, die nach den Verfahren gemäß den Beispielen 1 und 2 hergestellt wurde, und die etwa 6,1 Gew.-% D-Pantothensäure enthielt, wurde zunächst die Biomasse abgetrennt. Hierzu wurde 1 l der oben genannten Fermentationsbrühe mit einer Laborzentrifuge vom Typ Biofuge-Stratos der Firma Heraeus (Düsseldorf, Deutschland) für 20 Minuten bei 4.000 rpm zentrifugiert und der Zentrifugationsüberstand anschließend durch Cross-Flow Ultrafiltration mit einer MRC Polymermembran von 30kD in einer UF-Anlage der Firma ICT GmbH (Bad Homburg, Deutschland) weiter gereinigt.

[0047] Anschließend wurde unter Rühren absatzweise 10,1 g festes $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (96%; Firma MERCK, Darmstadt, Deutschland) zugegeben. Der pH-Wert betrug danach ca. 10,3. Die so behandelte Brühe wurde dann unter Vakuum bei 60°C in einem Rotationsverdampfer vom Typ Rotavapor RE-120 der Firma Büchi-Labortechnik GmbH (Konstanz, Deutschland) auf einen Flüssigkeitsanteil von etwa 50% Trockengehalt eingedunstet. Die so eingedunstete Brühe wurde anschließend zur Darstellung des Calciumsalzes der D-Pantothensäure sprühtrocknet. Hierzu wurde ein Laborsprühtrockner vom Typ Büchi-190 der Firma Büchi-Labortechnik GmbH (Konstanz, Deutschland) bei einer Eingangstemperatur von 107°C, einer Ausgangstemperatur von 85°C, einer Druckdifferenz von -40 mbar und einer Luftstromgeschwindigkeit von 600 NL/h eingesetzt.

[0048] Das so hergestellte Calcium D-Pantothemat-haltige Produkt besaß einen Gehalt von 68,5 Gew.-% D-Pantothensäure, war rieselfähig und hatte eine Schüttdichte von 460 mg/ml. Nach einer Lagerzeit von fünf Monaten betrug der Gehalt an D-Pantothensäure 67,6 Gew.-%.

Beispiel 4

Herstellung von D-Natrium-Pantothemat

[0049] Aus einer pantothensäurehaltigen Fermentationsbrühe, die nach den Verfahren gemäß den Beispielen 1 und 2 hergestellt wurde, und die etwa 6,1 Gew.-% D-Pantothensäure enthielt, wurde zunächst die Biomasse abgetrennt. Hierzu wurde 1 l der oben genannten Fermentationsbrühe so, wie in Beispiel 3 beschrieben, zentrifugiert und ultrafiltriert.

[0050] Anschließend wurde unter Rühren absatzweise 10,6 g NaOH (99%; Firma MERCK) zugegeben. Der pH-Wert betrug danach etwa 10. Die so behandelte

Brühe wurde dann unter Vakuum bei 50-60°C in einem Rotationsverdampfer vom Typ Rotavapor RE-120 der Firma Büchi-Labortechnik GmbH auf einen Flüssigkeitsanteil von etwa 50% Trockengehalt eingedunstet. Die so eingedunstete Brühe wurde anschließend zur Darstellung des Natriumsalzes der D-Pantothensäure in einem Gefriertrockner vom Typ LYOVAC GT 2 der Firma Leybold (Köln, Deutschland) lyophilisiert.

[0051] Das so hergestellte Natrium D-Pantothemat-haltige Produkt besaß einen Gehalt von 63,8 Gew.-% D-Pantothensäure und war rieselfähig. Nach einer Lagerzeit von fünf Monaten betrug der Gehalt an D-Pantothensäure 63,0 Gew.-%.

Beispiel 5

Herstellung von D-Magnesium-Pantothemat

[0052] Aus einer pantothensäurehaltigen Fermentationsbrühe, die nach den Verfahren von Beispiel 1 und 2 hergestellt wurde und die etwa 6,1 Gew.-% D-Pantothensäure enthielt, wurde zunächst die Biomasse abgetrennt. Hierzu wurde 1 l der oben genannten Fermentationsbrühe so wie in Beispiel 2 beschrieben zentrifugiert und ultrafiltriert.

[0053] Anschließend wurde unter Rühren absatzweise 5,4 g festes MgO (97%; Firma MERCK) zugegeben. Der pH-Wert betrug danach etwa 9 bis 10. Die so behandelte Brühe wurde dann unter Vakuum bei 60-60°C in einem Rotationsverdampfer vom Typ Rotavapor RE-120 der Firma Büchi-Labortechnik GmbH auf einen Flüssigkeitsanteil von etwa 50% Trockengehalt eingedunstet. Die so eingedunstete Brühe wurde anschließend zur Darstellung des Magnesiumsalzes der D-Pantothensäure in einem Gefriertrockner vom Typ LYOVAC GT 2 der Firma Leybold lyophilisiert.

[0054] Das so hergestellte Magnesium D-Pantothemat-haltige Produkt besaß einen Gehalt von 64,7 Gew.-% D-Pantothensäure und war rieselfähig. Nach einer Lagerzeit von fünf Monaten betrug der Gehalt an D-Pantothensäure 64,4 Gew.-%.

Beispiel 6

Herstellung von D-Kalium-Pantothemat

[0055] Aus einer pantothensäurehaltigen Fermentationsbrühe, die nach den Verfahren gemäß den Beispielen 1 und 2 hergestellt wurde, und die etwa 6,1 Gew.-% D-Pantothensäure enthielt, wurde zunächst die Biomasse abgetrennt. Hierzu wurde 1 l der oben genannten Fermentationsbrühe so, wie in Beispiel 2 beschrieben, zentrifugiert und ultrafiltriert.

[0056] Anschließend wurde unter Rühren absatzweise 17,4 g KOH (85%; Firma MERCK) zugegeben. Der pH-Wert betrug danach etwa 10 bis 11. Die so behandelte Brühe wurde dann unter Vakuum bei 60°C in einem Rotationsverdampfer vom Typ Rotavapor RE-

120 der Firma Büchi-Labortechnik GmbH auf einen Flüssigkeitsanteil von etwa 50% Trockengehalt eingeengt. Die so eingeengte Brühe wurde anschließend zur Darstellung des Kaliumsalzes der D-Pantothensäure in einem Gefrierrockner vom Typ LYOVAC GT 2 der Firma Leybold lyophilisiert.

[0057] Das so hergestellte Kalium D-Pantothemat haltige Produkt besaß einen Gehalt von 63,5 Gew.-% D-Pantothensäure und war rieselfähig. Nach einer Lagerzeit von fünf Monaten betrug der Gehalt an D-Pantothensäure 62,9 Gew.-%.

Beispiel 7

Herstellung von D-Ammonium-Pantothemat

[0058] Aus einer pantothensäurehaltigen Fermentationsbrühe, die nach den Verfahren gemäß den Beispielen 1 und 2 hergestellt wurde und die etwa 6,1 Gew.-% D-Pantothensäure enthielt, wurde zunächst die Biomasse abgetrennt. Hierzu wurde 1 l der oben genannten Fermentationsbrühe so, wie in Beispiel 2 beschrieben, zentrifugiert und ultrafiltriert.

[0059] Die so behandelte Brühe wurde dann unter Vakuum bei 60°C in einem Rotationsverdampfer vom Typ Rotavapor RE-120 der Firma Büchi-Labortechnik GmbH auf einen Flüssigkeitsanteil von etwa 50% Trockengehalt eingeengt. Die so eingeengte Brühe wurde anschließend zur Darstellung des Ammoniumsalzes der D-Pantothensäure in einem Gefrierrockner vom Typ LYOVAC GT 2 der Firma Leybold lyophilisiert.

[0060] Das so hergestellte Ammonium D-Pantothemat haltige Produkt besaß einen Gehalt von 66,8 Gew.-% D-Pantothensäure und war rieselfähig.

Beispiel 8

Herstellung von D-Calcium-Pantothemat aus einer biomassehaltigen Fermentationsbrühe

[0061] Eine pantothensäurehaltigen Fermentationsbrühe, die nach den Verfahren gemäß den Beispielen 1 und 2 hergestellt wurde, und die etwa 6,1 Gew.-% D-Pantothensäure enthielt, wurde zunächst unter Vakuum bei 60°C in einem Rotationsverdampfer vom Typ Rotavapor RE-120 der Firma Büchi-Labortechnik GmbH (Konstanz, Deutschland) ein Volumen von 1,0 l auf einen Flüssigkeitsanteil von etwa 30% Trockengehalt eingeengt. Anschließend wurde unter Rühren absatzweise 10,1 g festes $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (98%; Firma MERCK, Darmstadt, Deutschland) zugegeben. Der pH-Wert betrug danach ca. 10. Die so behandelte und eingeengte biomassehaltige Brühe wurde anschließend zur Darstellung des Calciumsalzes der D-Pantothensäure sprühtrocknet. Hierzu wurde ein Laborsprührockner vom Typ Büchi-190 der Firma Büchi-Labortechnik GmbH (Konstanz, Deutschland) bei einer Eingangstemperatur von 107°C, einer Ausgangstempe-

natur von 85°C, einer Druckdifferenz von -40 mbar und einer Luftstromgeschwindigkeit von 600 NL/h eingesetzt.

[0062] Das so hergestellte Calcium D-Pantothemat haltige Produkt besaß einen Gehalt von 49,8 Gew.-% D-Pantothensäure, war rieselfähig und hatte eine Schüttdichte von 480 mg/ml. Der Biomasse-Gehalt betrug ca. 90 Gew.-%.

Beispiel 9

Herstellung eines D-Calcium-Pantothemat und Biomasse von *Corynebacterium glutamicum* enthaltenden Produktes

1. Herstellung eines Pantothensäure produzierenden Stammes von *Corynebacterium glutamicum*

[0063] In der Patentschrift US-A-5,188,948 ist der L-Valin produzierende Stamm *Brevibacterium lactofermentum* FERM BP-1763 beschrieben. Aus der DE 1965513.7 ist das Plasmid pND-DBC2 (Abbildung 1) bekannt, welches die Gene panB, panC und panD von *Corynebacterium glutamicum* trägt. Das Plasmid ist in Form des Stammes ATCC13032/pND-DBC2 als DSM 12437 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Deutschland) hinterlegt. Durch Transformation des Stammes FERM BP-1763 mit dem Plasmid pND-DBC2 entstand der Pantothensäure produzierende Stamm FERM BP-1763/pND-DBC2.

2. Herstellung einer Pantothensäure haltigen Fermentationsbrühe

[0064] Eine Probe von *Brevibacterium lactofermentum* FERM BP-1763/pND-DBC2 wurde auf HfK-Agar ausgestrichen.

[0065] HfK-Agar besteht aus Hirm-Herz-Agar, der von der Firma Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) bezogen und mit Kanamycin supplementiert wurde. Die Zusammensetzung des HfK-Agars ist in Tabelle 8a angegeben.

[0066] Diese Agarplatten-Kultur wurde 17 Stunden bei 37°C inkubiert und dann im Kühlschrank bei +4°C aufbewahrt. Ausgewählte Einzelkolonien wurden anschließend auf dem gleichen Medium weiter vermehrt. Mit einer Impföse wurde Zellmaterial eines Kions vom HfK-Agar abgenommen und in 100 mL HfK-Bouillon übertragen, die in einem Schüttelkolben von 1000 mL Gesamtvolumen enthalten waren.

[0067] HfK-Bouillon besteht aus Hirm-Herz-Medium, das von der Firma Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) bezogen und mit Glucose und Kanamycin supplementiert wurde. Die Zusammensetzung der HfK-Bouillon ist in Tabelle 8b angegeben.

Tabelle 8a

HHK-Agar	
Substanz	Menge pro Liter
Hirn-Herz-Agar	52,0 g
Kanamycin	25 mg

Tabelle 8b

HHK-Bouillon	
Substanz	Menge pro Liter
Hirn-Herz-Medium	37,0 g
Kanamycin	25 mg
Glucose	20,0 g

[0068] Der Ansatz wurde bei 30°C und 150 rpm für 22 Stunden inkubiert. Nach Ende der Kultivierung wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von 660 nm (OD 660) eine optische Dichte von 6,1 gemessen. Diese Kultur des Stammes FERM BP-1763/pND-DBC2 wurde zur Beimpfung des Produktionsfermenters verwendet.

[0069] Zur Fermentation wurde das in Tabelle 8c angegebene Medium SK-71 verwendet. Alle Komponenten des SK-71-Mediums wurden direkt entsprechend der Arbeitskonzentrationen im Fermenter vorgelegt und in situ sterilisiert.

Tabelle 8c

Medium SK-71	
Verbindung	Menge pro Liter
Glucose Hydrat	110,000g
Cornsteep Liquor (CSL)	5,000g
β -Alanin	5,000g
Nicotinsäure	0,0050g
Isoleucin	0,1500g
Homoserin	0,1500g
Ammoniumsulfat	25,000g
K-dihydrogenphosphat	0,1000g
Mg-Sulfat $7H_2O$	1,0000g
Fe-Sulfat $7H_2O$	0,0100g
Mn-Sulfat H_2O	0,0050g

Tabelle 8c (fortgesetzt)

Medium SK-71	
Verbindung	Menge pro Liter
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,0100g
Thiamin HCl	0,0002g
D-(+)-Biotin	0,0003g
Struktol	0,60g

[0070] Als Fermenter wurden 10 l Rührreaktoren der Firma B.Braun (BBI, Deutschland, Melsungen, Modell Biostat E/ED) verwendet.

[0071] Zur Inokulierung von 1950 g des Fermentationsmediums SK-71 wurden 100 mL der oben beschriebenen Schüttelkolbenvorkultur in HHK-Bouillon eingesetzt.

[0072] Der Ansatz wurde über die gesamte Fermentationsdauer bei einer Temperatur von 30°C, einer volumenspezifischen Belüftung von 0,75 vvm, einer vom Sauerstoffverbrauch abhängigen Rührung von 800 - 1700 rpm und einem pH von 7,0 und einem Sauerstoffpartialdruck von 20% der Luft sättigung kultiviert. Die Kultur wurde insgesamt für 49 Stunden unter den obengenannten Bedingungen bis zum Erreichen einer OD660 von 26,2 kultiviert. Als Korrekturmittel zur pH-Wertregulierung wurde eine wässrige Ammoniak-Lösung (25 % w/v) verwendet.

[0073] Anschließend wurden die optische Dichte (OD) mit einem Digitalphotometer vom Typ LPIW der Firma Dr. Bruno Lange GmbH (Berlin, Deutschland) bei einer Meßwellenlänge von 660 nm und die Konzentration an gebildeter D- Pantothensäure mittels HPLC (Hypersil APS 2 5 μ m, 250x5 mm, RI-Detektion) bestimmt.

[0074] In der Fermentationsendprobe wurde nach 49 Stunden eine D-Pantothensäure Konzentration von ca. 0,2 g/l gemessen.

3. Herstellung eines Pantothensäure haltigen Produktes

[0075] Eine D-Pantothensäure haltige Fermentationsbrühe mit einem Gehalt von etwa 0,02 Gew.-% D-Pantothensäure wurde nach dem Verfahren von Beispiel 9.2 hergestellt. Ein Volumen von 1,4 l dieser Fermentationsbrühe wurde zunächst unter Vakuum bei 60°C in einem Rotationsverdampfer vom Typ Rotavapor RE-120 der Firma Büchi-Labortechnik GmbH (Konstanz, Deutschland) auf eine Brühe von etwa 15% Trockengehalt eingedunstet. Anschließend wurde unter Rühren absatzweise 27,1 g festes $Ca(OH)_2$ (96%; Firma MERCK, Darmstadt, Deutschland) zugegeben. Der pH-Wert betrug danach ca. 10,0. Die so behandelte und eingedunstete biomassehaltige Brühe wurde anschließend mit 37,7 g Calcium D-Pantothemat (>98 %, Euro OTC Pharma GmbH, Kamen, Deutschland) versetzt.

Für die anschließende Sprühtrocknung wurde ein Laborsprühtrockner vom Typ Blich-190 der Firma Blich-Labortechnik GmbH (Konstanz, Deutschland) bei einer Eingangstemperatur von 107°C, einer Ausgangstemperatur von 85°C, einer Druckdifferenz von -40 mbar und einer Luftstromgeschwindigkeit von 800 NL/h eingesetzt.

[0076] Das so hergestellte Calcium D-Panthenat haltige Produkt besaß einen Gehalt von ca. 35 % D-Panthenensäure, war rieselfähig und hatte eine Schüttdichte von 800 mg/ml. Der Anteil an C. glutamicum - Biomasse betrug ca. 3,5 Gew.-%.

Beispiel 10

Herstellung eines D-Calcium-Panthenat und Biomasse von *Saccharomyces cerevisiae* enthaltenden Produktes

1. Herstellung eines Panthenensäure produzierenden Stammes von *Saccharomyces cerevisiae*

Amplifikation des Leserasters YHR063c:

[0077] Ausgehend von der Nukleotidsequenz des *Saccharomyces cerevisiae* Leserasters YHR063c (Accession Nr. U00051 des National Center for Biotechnology, Bethesda, MD, USA) wurden die nachstehenden PCR-Primer synthetisiert (MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland). Anfang bzw. Ende des Leserasters sind durch einen Punkt (.) gekennzeichnet:

- *pJD639* (5' EcoRI-Nott START):
5'- GCG CGA ATT CAG ATC CGC GGC CGC AAA GAG GAG AAA TTA ACTATG ACT GCA CCA CAC AGA AG -3'
- *pJD640* (3' SpeI-PstI STOP):
5'- CGC GAC TAG TCT GCA GTC AGT CCT TTC TCC AGT CAC -3'

[0078] Als Template diente genomische DNA des *S. cerevisiae* Stammes JD242, die nach der Methode von C. Guthrie und G.R. Fink (Guide to yeast genetics and molecular biology, Methods in Enzymology, Vol. 194, Academic Press, San Diego, CA, 1991) isoliert wurde. Dieser Stamm ist eine haploide Segregante des diploiden Stammes SC288C (Winston et al., Yeast 11, 53ff. (1995)), dessen Genom sequenziert wurde (Goffeau et al., Science 274, pp 546, (1996)). Die Tetradenanalyse erfolgte nach der Methode von C. Guthrie und G.R. Fink (Guide to yeast genetics and molecular biology, Methods in Enzymology, Vol. 194, Academic Press, San Diego, CA, 1991). Der Stamm JD242 ist auxotroph für Leucin (*leu2Δ1* Allel) und Uracil (*ura3-52* Allel). Ein etwa 1,2 kbp großes DNA-Fragment konnte unter Verwendung des High Fidelity Expand Polymerase Kits der Firma Roche (Mannheim) durch 28 PCR-

Zyklen unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen amplifiziert werden. Die Größe wurde durch elektrophoretische Auftrennung in einem 0,8%igen Agarosegel bestimmt.

Konstruktion von *pJD-YHR063c*:

[0079] Zur Expression des YHR063c Leserasters in *S. cerevisiae* wurde das PCR-Amplifikat in den *E. coli* - *S. cerevisiae* Pendelvektor *pJDCX2* eingebaut (Abbildung 2 und Dohmen et al., 1995, Journal of Biological Chemistry 270, 18099-18109).

[0080] Das PCR-Produkt wurde zunächst mit EcoRI und SpeI (AGS, Heidelberg, Deutschland) restrigiert. Anschließend wurde es mit *pJDCX2*-DNA, welche mit EcoRI und XbaI (AGS, Heidelberg, Deutschland) behandelt worden war, gemischt und mit T4-DNA Ligase (Roche, Mannheim, Deutschland) ligiert. Der Ligationsansatz wurde in den *E. coli* Stamm XL1-Blue (Bullock et al., 1987, Biotechniques 5, 378) transformiert. Transformanten wurde durch Selektion auf LB-Agar, welcher 150 µg/ml Ampicillin (Sigma, Dessauhofen, Deutschland) enthält, erhalten. Die Plasmid-DNA aus den Ampicillin resistenten Klonen wurde durch alkalische Lyse präpariert (Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Die isolierte Plasmid-DNA wurde dann durch Restriktion mit Nott und PstI und anschließender Auftrennung im 0,8%igen Agarosegel untersucht. Das Plasmid mit der gewünschten Struktur erhielt den Namen *pJD-YHR063c* (Abbildung 3).

Herstellung von Stamm JD242/*pJD-YHR063c*:

[0081] Der *S. cerevisiae* Stamm JD242 wurde mit dem Plasmid *pJD-YHR063c* nach der Methode von Dohmen et al. transformiert (Dohmen et al., Yeast 7, 691 (1991)). Die Selektion auf Transformanten erfolgte auf leucinrahem Minimalmedium SD mit 1,8% Agar (siehe Tabelle 9a und 9b).

Tabelle 9a

Minimalmedium SD	
Verbindung	Menge pro Liter
(NH ₄) ₂ SO ₂	5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,5 g
NaCl	0,1 g
CaCl ₂	0,1 g
H ₃ BO ₃	500 µg
CuSO ₄	40 µg
KI	100 µg

Tabelle 9a (fortgesetzt)

Minimalmedium SD	
Verbindung	Menge pro Liter
$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	200 μg
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	400 μg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	400 μg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	200 μg
Biotin	2 μg
Folsäure	2 μg
Inositol	2 mg
Niacin	400 μg
p-Aminobenzoesäure	250 μg
Pyridoxin Hydrochlorid	400 μg
Riboflavin	200 μg
Thiamin Hydrochlorid	400 μg

Tabelle 9b

Minimalmedium SD	
Zusätze	Menge pro Liter
Glucose	20 g
Uracil	40 mg
CuSO_4	24 mg
-Leu DO Supplement	650 mg
Ketopantotat	100 mg
β -Alanin	100 mg

2. Herstellung einer Pantothensäure haltigen Fermentationsbrühe

[0082] Zur Herstellung einer D-Pantothensäure haltigen Fermentationsbrühe wurde zunächst eine Einzelkolonie von *S. cerevisiae* Stamm JD242/pJD-YHR063c auf einer Agarplatte mit Minimalmedium SD ausgestrichen und 3 Tage bei 30°C inkubiert. Zur Herstellung dieser ersten Vorkultur im Schüttelkolben wurden anschließend die Zellen mit 5 mL des Minimalmediums SD abgewaschen. Mit 2,5 mL dieser Zellsuspension wurde dann jeweils ein Schüttelkolben (500 mL Gesamtvolumen) mit 50 mL Minimalmedium SD (Tabelle 9a und 9b) angereicht und bei 30°C und 130 rpm auf einem RC-1-TK Inkubator der Firma Infors AG (Bottmingen, Schweiz) für 6 Stunden kultiviert, bis eine optische Dichte bei einer Wellenlänge von 660 nm (OD660) von 1,9 gemessen werden konnte. Die zweite Vorkultur wurde in einem 1.000 mL Schüttelkolben in

150 mL Minimalmedium SD (Tabelle 9a und 9b) angesetzt und mit jeweils 50 mL der oben beschriebenen Vorkultur 1 beimpft. Die Inkubation erfolgte bei 30°C und 80 rpm für 20 Stunden, bis eine optische Dichte bei einer Wellenlänge von 660 nm (OD 660) von ca. 3,8 erreicht wurde. Die Hauptfermentation zur Produktion der Pantothensäure wurde im Rundkolben mit 6000 mL Gesamtvolumen in 1500 mL Minimalmedium SD (Tabelle 9a und 9b) durchgeführt. Hierzu wurde der Rundkolben mit jeweils 90 mL der Vorkultur 2 beimpft und anschließend bei 30°C und 60 rpm für 36 Stunden inkubiert.

[0083] Die optische Dichte (OD) wurde mit einem Digitalphotometer vom Typ LP1W der Firma Dr. Bruno Lange GmbH (Berlin, Deutschland) bei einer Meßwellenlänge von 660 nm gemessen. Die Bestimmung der Konzentration an gebildeter D-Pantothensäure erfolgte mit Hilfe des Stammes *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014 nach Angaben des Handbuchs "DIFCO MANUAL" der Firma DIFCO (Michigan, USA, 10th Edition, 1100-1102 (1984).

[0084] Die optische Dichte (OD660) betrug ca. 4 und der Gehalt an D-Pantothensäure etwa 1 mg/L.

3. Herstellung eines Pantothensäure haltigen Produktes

[0085] Eine pantothensäurehaltigen Fermentationsbrühe mit einem Gehalt von etwa 1 mg/L D-Pantothensäure wurde nach dem Verfahren von Beispiel 10.2 hergestellt. Ein Volumen von 6,0 l wurde zunächst unter Vakuum bei 60°C in einem Rotationsverdampfer vom Typ Rotavapor RE-151 der Firma Büchi-Labortechnik GmbH (Konstanz, Deutschland) zu einer Brühe von etwa 16% Trockengehalt eingedunstet. Anschließend wurde unter Rühren absatzweise 15,9 g festes $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (96%; Firma MERCK, Darmstadt, Deutschland) zugegeben. Der pH-Wert betrug danach ca. 9,2. Die so behandelte und eingedunstete biomassereiche Brühe wurde anschließend mit 28,4 g Calcium D-Pantothemat(>98 %, Euro OTC Pharma GmbH, Kamen, Deutschland) versetzt. Die Brühe wurde anschließend in einem Gefriertrockner vom Typ LYONAC GT 2 der Firma Laybold (Köln, Deutschland) lyophilisiert.

[0086] Das so hergestellte Calcium D-Pantothemat haltige Produkt besaß einen Gehalt von 26,5 Gew.-% D-Pantothensäure, war rieselfähig und hatte eine Schüttdichte von 450 mg/mL. Der Anteil an *S. cerevisiae*-Biomasse betrug ca. 6,6 Gew.-%.

Abbildungen:

[0087] Folgende Abbildungen sind beigelegt:

- Abbildung 1: Karte des Plasmids pND-DBC2
- Abbildung 2: Karte des Plasmids pJDCX2
- Abbildung 3: Karte des Plasmids pJD-YHR063c

[0088] Die verwendeten Abkürzungen haben folgende Bedeutung:

Zu Abbildung 1:

[0089]

rmbT1T2: Transkriptions-Terminator des rmb-Gens

Ptac: tac Promotor

panB: Kodierbereich des panB Gens

panC: Kodierbereich des panC Gens

panD: Kodierbereich des panD Gens

rep-C.g.: DNA-Region für Replikation in *C. glutamicum*

oriV-E.c.: Ursprung für vegetativen Transfer in *E. coli*

kan: Resistenzgen für Kanamycin

BglII: Schnittstelle des Restriktionsenzym BglII

ClaI: Schnittstelle des Restriktionsenzym ClaI

NcoI: Schnittstelle des Restriktionsenzym NcoI

NruI: Schnittstelle des Restriktionsenzym NruI

PvuI: Schnittstelle des Restriktionsenzym PvuI

SacI: Schnittstelle des Restriktionsenzym SacI

Sall: Schnittstelle des Restriktionsenzym Sall

ScaI: Schnittstelle des Restriktionsenzym ScaI

SphI: Schnittstelle des Restriktionsenzym SphI

XhoI: Schnittstelle des Restriktionsenzym XhoI

Zu Abbildung 2 und 3:

[0090]

5 LEU2: Beta-Isopropylmalat Dehydrogenase-Gen von *Saccharomyces cerevisiae*

2µ: Sequenzen des endogenen 2µ Plasmides von *Saccharomyces cerevisiae*

10 Ap^R: Beta-Lactamase-Gen

P-CUP1: Promotor des *Saccharomyces cerevisiae* CUP1-Gens (Metallothionein)

15 T-CYC1: Terminator des CYC1-Gens (Cytochrom C) von *Saccharomyces cerevisiae*

SD: Shine Dalgarno Sequenz

20 EcoRI: Schnittstelle des Restriktionsenzym EcoRI

NotI: Schnittstelle des Restriktionsenzym NotI

25 SphI: Schnittstelle des Restriktionsenzym SphI

XbaI: Schnittstelle des Restriktionsenzym XbaI

Patentsprüche

1. D-Pantothensäure und/oder deren Salze enthaltende Tierfüttermittel-Additive auf Fermentationsbrühe-Basis, dadurch gekennzeichnet, daß sie

- a) D-Pantothensäure und/oder deren Salze,
- b) die während der Fermentation der D-Pantothensäure produzierenden Mikroorganismen gebildete Biomasse in einer Menge von 0 bis 100 %,
- c) zumindest den überwiegenden Teil der weiteren Inhaltsstoffe der Fermentationsbrühe enthalten und
- d) in fester, feinteiliger oder granulierter, fließfähiger Form vorliegen.

2. Tierfüttermittel-Additive gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,

daß sie eines oder mehrere der Salze, ausgewählt aus der Gruppe der Natrium-, Kalium-, Ammonium-, Magnesium- oder Calciumsalze der D-Pantothensäure enthalten.

3. Tierfüttermittel-Additive gemäß den Ansprüchen 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet,

- daß sie die D-Pantothensäure und/oder eines ihrer Salze in einer Menge von > 0, insbesondere 20 bis 80 Gew.-%, (Trockenmasse) enthalten.
4. Tierfuttermittel-Additive gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
- daß sie in sprühtrockneter oder sprühtrockneter Form vorliegen.
5. Tierfuttermittel-Additive gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet,
- daß sie zusätzlich eine oder mehrere der L-Aminosäuren enthalten, ausgewählt aus der Gruppe L-Methionin, L-Lysin, L-Valin, L-Alanin, L-Threonin oder L-Tryptophan.
6. Verfahren zur Herstellung von D-Pantothensäure und/oder deren Salze enthaltenden Futtermittel-Additiven gemäß den Ansprüchen 1 bis 5 aus Fermentationsbrühen, dadurch gekennzeichnet, daß man
- a) aus D-Pantothensäure und/oder deren Salze enthaltenden Fermentationsbrühe gegebenenfalls vollständig oder teilweise die Biomasse und/oder einen Teil der weiteren Inhaltsstoffe abtrennt,
- b) die so erhaltene Lösung bzw. Brühe mit dem Hydroxid oder Oxid eines Erdalkali- oder Alkalimetalls versetzt und
- c) das so erhaltene Gemisch trocknet oder sprühtrocknet, sprühtrocknet oder granuliert.
7. Verfahren gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet,
- daß man ein Oxid oder Hydroxid, ausgewählt aus der Gruppe der Natrium-, Kalium-, Ammonium-, Magnesium- oder Calciumverbindungen, in einem stöchiometrischen Verhältnis von 0,8 bis 1,2 vorzugsweise 0,95 bis 1,1 bezogen auf die D-Pantothensäure zusetzt.
8. Verfahren zur Herstellung von D-Pantothensäure und/oder deren Natrium-, Kalium-, Ammonium-, Magnesium- oder Calcium-Salze enthaltenden Futtermittel-Additiven gemäß den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man
- a) aus einer unter Verwendung der gewünschten Hydroxyverbindungen gewonnenen D-Pantothensäure Fermentationsbrühe
- gegebenenfalls vollständig oder teilweise die Biomasse und/oder einen Teil der Inhaltsstoffe abtrennt,
- b) das so erhaltene Gemisch vorzugsweise durch Entfernen von Wasser aufkonzentriert, und
- c) das das entsprechende Pantothinat enthaltende Futtermitteladditiv durch Trocknen, Sprühtrocknen oder Sprühtrocknung in fester Form gewinnt.
9. Verfahren zur Herstellung von Tierfuttermittel-Additiven mit einem Gehalt an D-Pantothensäure und/oder dessen Natrium-, Kalium-, Ammonium-, Magnesium- oder Calciumsalzen in dem Bereich von etwa 20 bis 80 Gew.-% (Trockenmasse) aus Fermentationsbrühen, gekennzeichnet durch die Schritte
- a) bevorzugt Entfernen von Wasser aus der Fermentationsbrühe (Aufkonzentration),
- b) gegebenenfalls Entfernen der während der Fermentation gebildeten Biomasse in einer Menge von 0 bis 100 %,
- c) Zusatz von einer oder mehreren der genannten Verbindungen zu den gemäß a) und b) erhaltenen Fermentationsbrühen, wobei die Menge der zugesetzten Verbindungen so bemessen ist, daß deren Gesamtkonzentration im Tierfuttermittel-Additiv im Bereich von etwa 20 bis 80 Gew.-% liegt, und
- d) Trocknen der gemäß c) erhaltenen Fermentationsbrühe, um das Tierfuttermittel-Additiv in der gewünschten Pulver- oder Granulatform zu erhalten.
10. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet,
- daß man die Fermentationsbrühe vor oder nach der bevorzugt durchgeführten Aufkonzentrierung mit einem Oxid oder Hydroxid der genannten Alkali- oder Erdalkalimetalle versetzt.
11. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 bis 9, dadurch gekennzeichnet,
- daß man in der Fermentation Pilze oder Hefen einsetzt
12. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet,
- daß man der gegebenenfalls aufkonzentrierten

Fermentationsbrühe eine oder mehrere L-Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-Lysin, L-Valin, L-Alanin, L-Threonin oder L-Tryptophan zusetzt.

5

13. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 bis 11, dadurch gekennzeichnet,

daß man in der Fermentation Bakterien der Gattung *Corynebacterium* einsetzt.

10

14. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 bis 11, dadurch gekennzeichnet,

daß man in der Fermentation Bakterien der Familie *Enterobacteriaceae* einsetzt.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Abbildung 1:

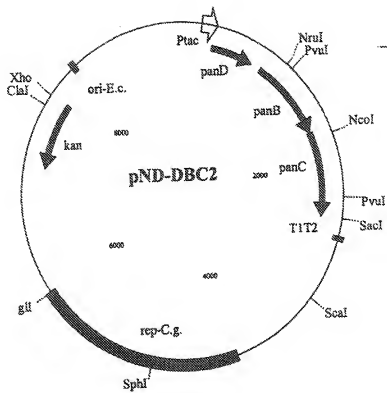


Abbildung 2:

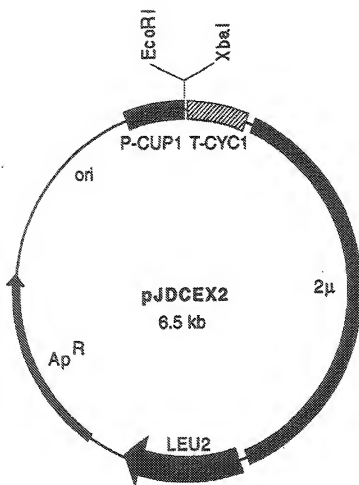
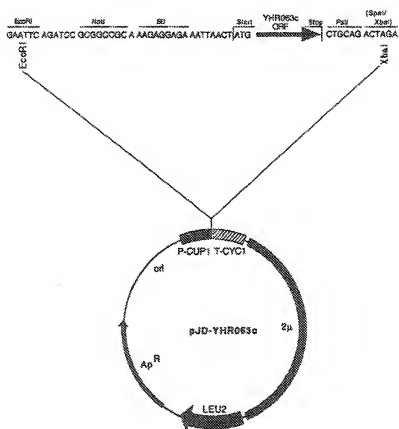


Abbildung 3:





Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 00 10 8826

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
X	GB 598 177 A (COMMERCIAL SOLVENTS CORPORATION) 12. Februar 1948 (1948-02-12) * Seite 1, Zeile 42-47 * * Seite 2, Zeile 9-19 * * Anspruch 1 *	1,3,4,6,8	A23K1/16
Y		2,5,12-14	
A		9-11	
Y	GB 784 434 A (MERCK & CO., INC.) 9. Oktober 1957 (1957-10-09) * Seite 1, Zeile 10-25 * * Seite 2, Zeile 4-15 * * Ansprüche 1,6 *	2	
A		7	
Y	EGGELING, L., MORBACH, S., AND SAHM, H.: "The fruits of molecular physiology: engineering the L-isoleucine biosynthesis pathway in <i>Corynebacterium glutamicum</i> " JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, Bd. 55, 1997, Seiten 167-182, XP004103426 ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL ISSN: 0168-1656 * Seite 167, Spalte 1 - Seite 169, Spalte 1; Abbildung 1 *	5,12-14	
			RECHERCHIERTE BACHGEBIETE (Int.Cl.7)
			A23K
Der vorliegende Forschungsbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Rechenbericht		Abschließende der Recherche	
DEN HAAG		18. August 2000	
		Führer	
		Rooney, K	
KATEGORIE DER BENANNEN DOKUMENTE			
<p>X: von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y: von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A: technologischer Hintergrund O: schriftliche Offenbarung P: Zwischenliteratur</p> <p>T: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E: älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D: in der Anmeldung angeführtes Dokument L: aus anderen Gründen angeführtes Dokument</p> <p>A: Mitglied der gleichen Patentfamilie, Lebenswissenschaftliches Dokument</p>			

EPIC FORM 1503 (02.02.99) (P)

ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.

EP 00 10 8826

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
Diese Angaben dienen nur zur Orientierung und erfolgen ohne Gewähr.

18-08-2000

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
GB 598177	A	KEINE	
GB 784434	A	KEINE	

EPO Form P/01

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang: siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr. 12/89